ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 50, 1, 2016

УДК 576.895.122.21

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА 28 КДА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ТРЕМАТОДЫ OPISTHORCHIS FELINEUS И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

© И. А. Разумов,[1, 2] М. Ю. Помазной,[1] П. А. Белавин,[1]
Е. П. Пономарева,[2] В. А. Мордвинов[1]

[1] Институт цитологии и генетики СО РАН
пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090
E-mail: razumov@bionet.nsc.ru
[2] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Кольцово, НСО, Новосибирский р-н, 630559
Поступила 02.04.2015

Описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felineus*, представляет серьезную угрозу населению России. Поэтому актуальна разработка новых систем иммунодиагностики с применением рекомбинантных аналогов белков *O. felineus*. Цель данного исследования — получение рекомбинантной 28 kDa глутатион-S-трансферазы (GST) *O. felineus* в системе *E.coli* и оценка возможности ее использования для иммунодиагностики описторхоза. Для получения такого белка была использована плазмида pET20b(+)-GST, содержащая открытую рамку считывания 28 kDa GST *O. felineus* (639 нуклеотидов, кодирующие 213 аминокислотных остатков) из нашей кДНК библиотеки (Pomaznoy et al., 2013). Установлено, что синтезируемый рекомбинантный белок rOF28-GST реагирует в ИФА и иммуноблоте с антителами сывороток больных описторхозом и не взаимодействует с сыворотками здоровых доноров. Результаты исследования указывают на потенциальную пригодность rOF28-GST для разработки новых иммунотестов для выявления описторхоза.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, описторхоз, рекомбинантный белок, 28 kDa глутатион-S-трансфераза, иммунодиагностика.

Описторхоз — гельминтоз, поражающий преимущественно гепатобилиарную систему и поджелудочную железу. Возбудителями описторхоза являются 2 вида печеночных сосальщиков, трематод сем. Opisthorchiidae: *Opisthorchis felineus* в странах Евразии и *Opisthorchis viverrini* в Юго-Восточной Азии (Schuster, 2010). Чрезвычайно близкое по симптоматике заболевание, клонорхоз, вызывают печеночные сосальщики вида *Clonorchis sinensis*, также входящего в сем. Opisthorchiidae. Клонорхоз распространен на Дальнем Востоке и в странах восточной Азии, в частности, в Китае (King, Scholz, 2001; Shen et al., 2009; Mordvinov et al., 2012).

Мировой опыт показывает, что для эффективного решения проблем, связанных с описторхозом, необходимо развитие методов профилактики, лечения и диагностики этого заболевания, в частности, иммунодиагностики. Перспективным подходом к повышению специфичности и чувствительности иммунодиагностических методов является использование в качестве антитело-связывающего субстрата рекомбинантных белков, сохраняющих антигенные детерминанты паразитарных белков (Shunyu et al., 2011; Mordvinov et al., 2012). В этой связи значительный интерес представляют исследования потенциальных белков-иммуногенов трематод *O. viverrini и C. sinensis (*Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2013). Показано, что рекомбинантные белки этих паразитов, полученные в прокариотической системе, могут быть использованы для иммунодиагностики описторхидозов (Hong et al., 2002; Shen et al., 2009; Shunyu et al., 2011). Стало известно, что среди экскреторно-секреторного продукта описторхид обнаруживаются в больших количествах глутатион трансферазы. Это значит, что высока вероятность появления антител, способных связываться с эпитопами этих белков у пациентов, страдающих описторхозом. Действительно, ранее на трематодах была показана эффективность использования глутатион трансфераз как маркеров описторхоза при постановке иммунологических тестов.

Ранее нами была получена библиотека кДНК *O. felineus* и проведен поиск потенциальных мишеней для развития методов иммунодиагностики описторхоза, вызванного этим паразитом. Установлено, что ген, кодирующий 28 kDa GST (GenBank: JK006511.1), входит в число наиболее высоко транскрибируемых генов *O. felineus* (Pomaznoy et al., 2013), а фермент 28 kDa GST является одним из основных белковых компонентов экскреторно-секреторного продукта гельминта (Львова и др., 2014). Информация об иммуногенных и антигенных свойствах отдельных белков *O. felineus* практически отсутствует, и нами предпринимаются первые шаги в этом направлении (Разумов и др., 2012).

Цель данной работы — получение рекомбинантного аналога фермента 28 kDa GST *O. felineus* в системе *E. coli*, определение антигенных свойств этого рекомбинантного белка и оценка возможности его использования для иммунодиагностики описторхоза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Коммерческие наборы фирм: Bio-Rad (Aurum™ Total RNA Mini Kit); Fermentas (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits); Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAquick PCR Purification Kit; QIAquick Nucleotide Removal Kit; QIAexpress kit type IV; QIAprep Spin Miniprep Kit; Applied Biosystems (Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1); ЗАО «Вектор-Бест (Описторхоз-IgG-ИФА-БЕСТ; Описторхоз-IgG-контрольная панель).

Ферменты и маркеры молекулярных весов. В работе использовали Phusion® ДНК-полимеразу («Finnzyme», Finland), Taq ДНК-полимеразу («СибЭнзим», Новосибирск), эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI и *Bgl*II («СибЭнзим», Новосибирск). Во всех реакциях использовали растворы и условия, рекомендованные производителем. Для определения длины фрагментов нуклеиновых кислот использовали λ ДНК/BssI («СибЭнзим», Россия). Для определения молекулярных весов белковых препаратов использовали маркеры молекулярных масс белков фирмы «Fermentas» (Литва).

Олигонуклеотиды. Праймеры для синтеза рамки трансляции гена GST (сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BglII и EcoRI выделены курсивом):

forward 5′ ACG*AGATCT*CATGAGTAGCGAAAAATACAA

reverse 5′ C*GAATTC*CCGAAAGGTGTGTCAGGACG

Олигонуклеотиды были приготовлены фирмой Биоссет (Новосибирск).

Создание генно-инженерной конструкции для получения рекомбинантного белка

Фрагмент ДНК, содержащий ген 28 кДа глутатион-S-трансферазы *O. felineus*, для клонирования в составе экспрессирующего вектора получали при помощи ПЦР с использованием плазмиды из библиотеки экспрессирующихся генов описторха (GenBank: JK006511.1). Эта плазмида содержит полную рамку считывания гена глутатинон трансферазы, с расчетной молекулярной массой 28 kDa. Для реакции использовали праймеры, несущие на 5′-концах сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BglII и EcoRI. Для клонирования применяли вектор pET 20b(+), предварительно гидролизованный рестриктазами BamHI и EcoRI. Вектор и клонируемый ПЦР продукт очищали от продуктов гидролиза при помощи мини-колонок (Sigma, USA). Далее гидролизованные вектор и ПЦР продукт, длиной 639 п. о. лигировали при помощи Т4 ДНК лигазы при 4 °С в течение ночи. Лигазную смесь трансформировали в штамм *E. coli* SoloPack Gold (Invitrogen, США) электропорацией. Выросшие на селективной среде колонии *E. coli* анализировали посредством ПЦР с праймерами, использовавшимися при получении фрагмента ДНК для клонирования. Колонии, в которых, по данным скрининга, имелась нужная вставка, нарабатывали, выделяли плазмидную ДНК и секвенировали по Сэнгеру.

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного белка

Для получения рекомбинантного белка использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный плазмидной ДНК pET20b(+)-GST, и обозначенный далее как *E. coli* BL21(DE3)pET20b(+)-GST. Трансформированных бактерий сначала культивировали с перемешиванием (200 об/мин) до плотности $OD_{600} = 0.6$, а затем проводили индукцию 0.3 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактозид). Индуцированную биомассу собирали центрифугированием и хранили при –20 °С.

Аффинную хроматографию растворимой фракции белков проводили с помощью набора фирмы QIAGEN на Ni-NTA агарозе, так как рекомбинантный белок содержал 6х His tag на конце.

Полученные клеточные лизаты штамма-продуцента и очищенные рекомбинантные белки анализировали методом белкового электрофореза (Sambrook et al., 1989) в 10—12%-ном геле. Концентрацию белка определяли путем измерения оптической плотности по протоколу «Bio-Rad-protein assay» на спектрофотометре Victor^{3}1420 (Perkin Elmer).

Иммуноблот и ИФА

Перенос белков после ЭФ и постановку иммуноферментной реакции осуществляли, как описано ранее (Котелкин и др., 1999). ИФА с рекомбинантным белком в качестве антигена проводили после сорбции нерастворимой фракции белка в растворе 2 М мочевины (50 мМ Tris, 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl), используя компоненты тест-системы фирмы Вектор-Бест, в соответствии с инструкцией производителя.

Коммерческие наборы, используемые в работе:

- Описторхоз-IgG-ИФА-БЕСТ (ЗАО «Вектор-Бест»);
- Описторхоз-IgG-контрольная панель сывороток (ЗАО «Вектор-Бест»), содержащая 4 позитивных и 4 негативных образца.

Программное обеспечение

При проведении анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей применяли компьютерные программы, представленные на сайтах NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ и http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), EXPASY (www.expasy.org), а также программы SignalP 4.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), PSIPRED v3.0 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) и NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного белка 28 kDa GST *O. felineus*

Конструкция из кДНК-библиотеки (Pomaznoy et al., 2013), содержащая полноразмерную рамку трансляции 28 kDa GST *O. felineus*, была использована для создания штамма *E. coli* — продуцента данного белка. Кодирующая часть 28 kDa GST *O. felineus* из библиотеки была переклонирована в экспрессирующий вектор pET 20 b(+), как описано выше (рис. 1).

Для получения рекомбинантного аналога белка 28 kDa GST *O. felineus* использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный плазмидой pET20b(+)-GST и обозначенный как *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-GST. Образцы биомассы анализировали с помощью белкового электрофореза

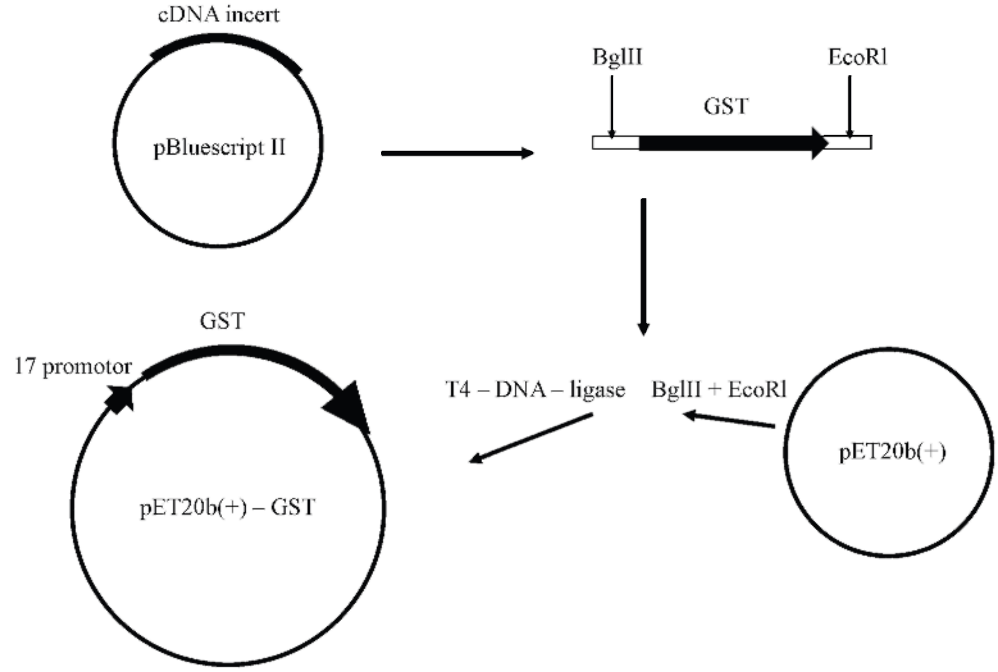

Рис. 1. Схема клонирования последовательности гена 28 kDa GST *O. felineus* в экспрессирующий вектор pET20b(+) для получения плазмиды pET20b(+)-GST.

Fig. 1. Cloning of the coding sequence for 28 kDa GST *O. felineus* into pET20b(+) vector.

по Лэммли на наличие экспрессии целевого продукта и его растворимости (рис. 2). Клоны, продемонстрировавшие наиболее высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка rOF28-GST с молекулярным весом около 29 кДа (рис. 2, *А*), были использованы для дальнейших экспериментов. Рекомбинантный белок накапливался в основном в тельцах включений (рис. 2, *Б*). Так, после разрушения клеток ультразвуком и сбора нерастворимой фракции центрифугированием оказалось, что содержание rOF28-GST в клеточном осадке составляло приблизительно 80 %. Цифровая обработка электрофореграмм показала, что чистота белка rOF28-GST после аффинной хроматографии растворимой фракции достигает 50—67 %. Таким образом, полученный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+)-GST обеспечивал биосинтез целевого продукта rOF28-GS в виде нерастворимой (≈90 %) и растворимой (≈10 %) фракции.

Определение антигенных свойств рекомбинантного белка

Для определения взаимодействия рекомбинантного белка rOF28-GST с антителами против белков *O. felineus* был использован набор позитивных сывороток от больных описторхозом и негативных сывороток здоровых доноров (ЗАО «Вектор-Бест»). Выявление позитивных антител в сыворотках проводили с помощью иммуноферментных реакций, ИФА и

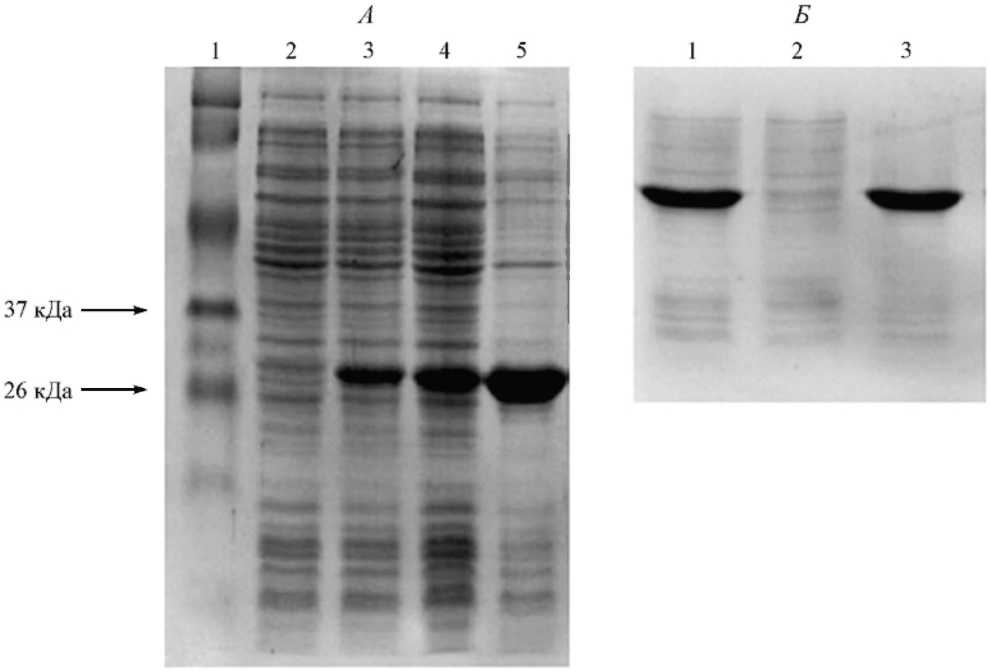

Рис. 2. Анализ экспрессии и очистки rOF28-GST с помощью белкового электрофореза (12.5 % гель).

А: 1 — белковые маркеры молекулярной массы, 2 — суммарная биомасса E. coli+pET20b(+)-GST без индукции ИПТГ, 3—5 образцы биомассы штамма после индукции ИПТГ (3 клона), *Б*: 1—2 — растворимая (цитоплазматическая фракция) штамма-продуцента, 3 — тельца включения (нерастворимая фракция).

Fig. 2. Expression and purification of recombinant rOF28-GST identified by 12.5 % SDS-PAGE.

иммуноблота, с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка.

Результаты анализа (рис. 3) демонстрируют, что rOF28-GST связывается с антителами позитивных сывороток (AC1 и AC2) больных описторхозом и не реагирует с антителами негативных сывороток (HC1 и HC2). Ранее нами было показано (Pakharukova et al., 2012; Pomaznoy et al., 2013; Львова и др., 2014), что взрослая марита *O. felineus*, как и другие близкородственные печеночные сосальщики, активно синтезирует белки системы инактивации ксенобиотиков и токсинов, в том числе различные классы глутатионтрансфераз (Калинина и др., 2010). Важно отметить, что фракция EST (expressed sequence tag), соответствующая 28 kDa GST, составляет 4.7 % от всех EST, представленных в библиотеке кДНК *O. felineus*. Такая же высокая представленность 28 kDa GST наблюдается и у близкородственных трематод *O. viverrini* и *C. sinensis* (Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2013). Установлено, что этот фермент входит в состав экскреторно-секреторного продукта гельминтов, а также обладает иммунореактивностью. Таким образом, 28 kDa GST представляется перспективной мишенью для диагностики и, возможно, создания вакцин. Однако, экспериментальные данные, полученные при тестировании рекомбинантных аналогов 28 kDa GST *O. viverrini* и *C. sinensis*, говорят о том, что использование для иммунодиагностики только одного аналога паразитарного бел-

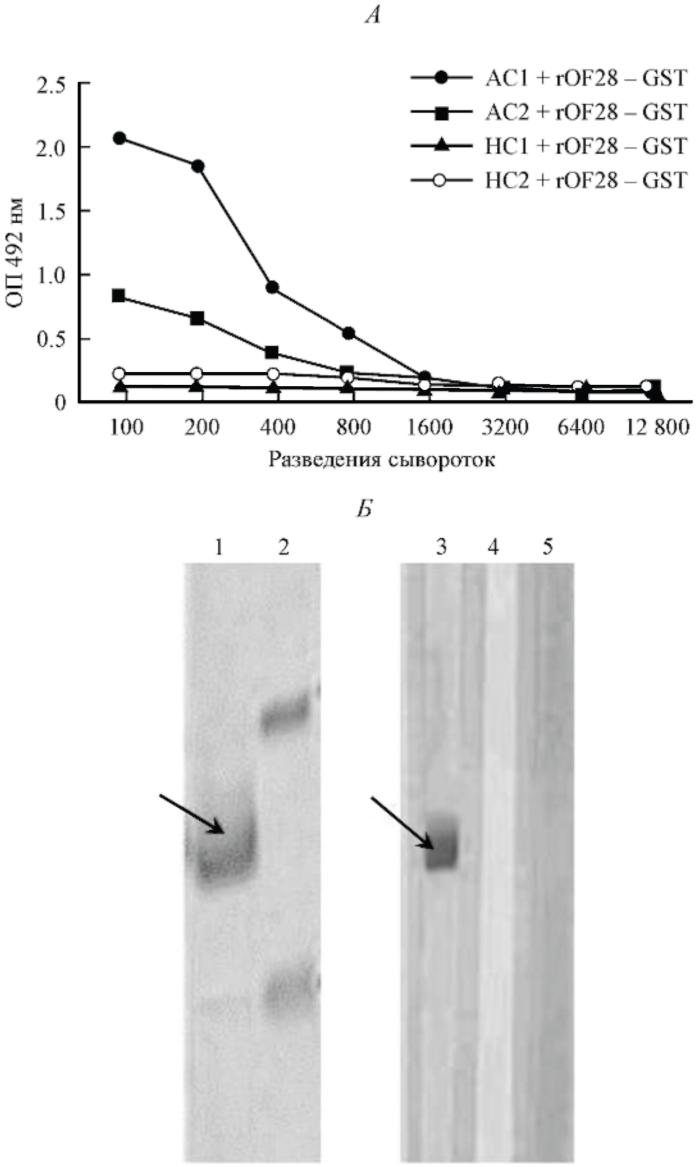

Рис. 3. Тестирование взаимодействия рекомбинантного белка rOF28-GST с позитивными антителами сывороток от больных описторхозом.

А: кривые реагирования позитивных антисывороток (AC1 и AC2) от больных описторхозом и отрицательных или нормальных сывороток от здоровых (HC1 и HC2) с rOF28-GST в ИФА. *Б*: 1—2 — электрофореграмма. 1 — очищенный rOF28-GST; 2 — маркеры молекулярного веса, 25 и 35 кДа (Fermentas); 3 — взаимодействие очищенного rOF28-GST с антителами позитивной сыворотки от больного описторхозом в иммуноблоте (помечено стрелкой); 4—5 — отсутствие реагирования с антителами сывороток здоровых людей.

Fig. 3. Definition of antigenicity of the rOF28-GST by ELISA and Western blot analysis to the opisthorchiasis patients sera.

ка, вероятно, недостаточно. Так, на основании данных, полученных при исследовании взаимодействия рекомбинантного 28 kDa GST *O. viverrini* с антителами сывороток больных описторхозом и здоровых доноров, был сделан вывод о том, что данный белок не пригоден для иммунодиагностики описторхоза вследствие низкого содержания позитивных антител и наличия циркулирующего антигена в крови больных (Eursitthichai et al., 2010). Результаты аналогичных экспериментов с рекомбинантным 28 kDa GST *C. sinensis* показали, что чувствительность и специфичность тест-системы ИФА с этим белком составили 14.5 и 98.9 % соответственно (Shen et al., 2009). Протестировав несколько рекомбинантных аналогов белков *C. sinensis*, авторы данной работы пришли к заключению, что для повышения чувствительности иммунодиагностики необходимо использовать комбинацию рекомбинантных белков. Этот вывод был подтвержден в другом исследовании, авторы которого выяснили, что комбинация из двух рекомбинантных белков 26 кДа GST и 28 кДа GST *C. sinensis* позволяет достичь 76 % чувствительности и 95 % специфичности тест-системы ИФА (Shunyu et al., 2011). На основании этих данных было высказано предположение, что для разработки эффективной тест-системы для выявления описторхид требуется тестирование целого ряда комбинаций рекомбинантных белков.

В нашей работе впервые получен штамм *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+)-GST, продуцирующий аналог 28 kDa GST *O. felineus*. В результате тестирования рекомбинантного белка в ИФА и иммуноблоте мы продемонстрировали специфическое взаимодействие rOF28-GST с антителами сывороток больных описторхозом. По-видимому, rOF28-GST может быть использован для проведения или совершенствования иммунодиагностики описторхоза, вызванного печеночным сосальщиком *O. felineus*. Кроме того, полученный rOF28-GST может быть использован для получения специфических для *O. felineus* антител и для анализа функциональной активности 28 kDa GST *O. felineus*, исследования роли этого белка в жизнедеятельности гельминта, а также для изучения взаимодействия «паразит—хозяин».

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась при финансовой поддержке бюджетного проекта № VI.60.1.1 (№ гос. регистрации 01201280335).

Список литературы

Львова М. Н., Дужак Т. Г., Центалович Ю. П., Катохин А. В., Мордвинов В. А. 2014. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*. Паразитология/ 48 (3): 169—184.

Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Алеид Р., Новичкова М. Д., Саприн А. Н., Березов Т. Т. 2010. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов. Вестник Российской АМН/ (3): 46—54.

Котелкин А. Т., Разумов И. А., Локтев В. Б. 1999. Получение и характеризация мышиных гибридом, секретирующих моноклональных антитела к основному растворимому антигену *Opisthorchis felineus*. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. (3): 6—10.

Разумов И. А., Львова М. Н., Пономарева Е. П., Катохин А. В., Петренко В. А., Сазонов А. Э., Огородова Л. М., Новицкий В. В., Сивков А. Ю., Мордвинов В. А. 2012. Антигенные свойства рекомбинантного аналога белка легумаин трематоды *Opisthorchis felineus*, вызывающей описторхоз у человека. Бюл. сиб. медицины. 11 (6): 166—171.

Eursitthichai V., Viyanant V., Tesana S., Sithithaworn P., Kosa N., Grams R. 2010. *Opisthorchis viverrini*: evaluation of 28 kDa glutathione S-transferase as diagnostic tool in human opisthorchiasis. Acta Tropica. 114 (2):76—80.

Hong S.-J., Yun Kim T., Gan X.-X. 2002. *Clonorchis sinensis*: glutathione S-transferase as a serodiagnostic antigen for detecting IgG and IgE antibodies. Experimental Parasitology. 101: 231—234.

King S., Scholz T. 2001. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. Korean Journal of Parasitology. 39: 209—221.

Mordvinov V. A., Yurlova N. I., Ogorodova L. M., Katokhin A. V. 2012. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. Parasitology International. 61 (1): 25—31.

Mulvenna J., Sripa B., Brindley P. J., Gorman J., Jones M. K., Colgrave M. L., Jones A., Nawaratna S., Laha T., Suttiprapa S., Smout M. J., Loukas A. 2010. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. Proteomics. 10 (5): 1063—1078.

Pakharukova M. Y., Ershov N. I., Vorontsova E. V., Katokhin A. V., Merkulova T. I., Mordvinov V. A. 2012. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: identification and characterization. Molecular and Biochemical Parasitology. 181 (2): 190—194.

Pomaznoy M., Tatkov S., Katokhin A., Afonnikov D., Babenko V., Furman D., Brusentsov I., Belavin P., Najakshin A., Guselnikov S., Vasiliev G., Sivkov A., Prokhortchouk E., Skryabin K., Mordvinov V. 2013. Adult *Opisthorchis felineus* major protein fractions deduced from transcripts: comparison with liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis*. Experimental Parasitology. 135 (2): 297—306.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1120 p.

Schuster R. K. 2010. Opisthorchiidosis — a review. Infect Disord Drug Targets, 10 (5): 402—415.

Shen C. L., Lee J. A., Allam S. R., Bae Y. M., Han E. T., Takeo S., Tsuboi T., Hong S. T., Choi M. H. 2009. Serodiagnostic applicability of recombinant antigens of *Clonorchis sinensis* expressed by wheat germ cell-free protein synthesis system. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 64 (3): 334—339.

Shunyu Li., Jung Guk Shin, Pyo Yun Cho, Tae Im Kim, Sung-Tae Hong, Sung-Yong Hong. 2011. Multiple recombinant antigens of *C. sinensis* for serodiagnosis of human clonorchiasis. Parasitology Research. 108 (5): 1295—1302.

Zheng M., Hu K., Liu W., Li H., Chen J., Yu X. 2013. Proteomic analysis of different period excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization, immunolocalization, and serological reactivity of two excretory secretory antigens-methionine aminopeptidase 2 and acid phosphatase. Parasitology Research. 112 (3): 1287—1297.

CLONING OF 28 KDA GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE OF THE TREMATODE OPISTHORCHIS FELINEUS AND ESTIMATION OF ANTIGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT PROTEIN

I. A. Razumov, M. Yu. Pomaznoy, P. A. Belavin,
E. P. Ponomareva, V. A. Mordvinov

Key words: *Opisthorchis felineus*, opisthorchiasis, recombinant protein, 28 kDa glutathione-S-transferase, immunodiagnosis.

SUMMARY

The liver fluke *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) is the causative agent of opisthorchiasis; it causes serious health problems among human populations in the territory of Russia. Our research has focused on the development of diagnostic tools to detect infection caused by the parasite. A full-length sequence encoding 28 kDa glutathione-S-transferase *O. felineus* was isolated from our cDNA library (Pomaznoy et al., 2013). The open reading frame contained 639 bp encoding 213 amino acids. We estimated potential of recombinant protein 28 kDa glutathione-S-transferase *O. felineus* (rOF28-GST) for application in immunodiagnosis of the opisthorchiasis. ELISA and western blot analysis showed that serum from patients infected with *O. felineus* could strongly react with purified rOF28-GST and healthy human sera could not. These results suggest the potential of this recombinant analogue of the 28 kDa glutathione S-transferase from *O. felineus* to develop the serodiagnostic test for human opisthorchiasis.